

097857214

28.10.99

日本国特許庁

JP 99/5979

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 20 DEC 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 3月 3日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第056253号

出願人
Applicant(s):

住友ベークライト株式会社

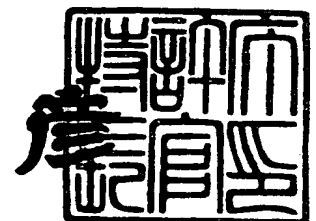
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3083880

【書類名】 特許願

【整理番号】 PK990305

【提出日】 平成11年 3月 3日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12M 1/00

【発明の名称】 免疫分析用容器

【請求項の数】 3

【発明者】

【住所又は居所】 秋田市土崎港相染町字中島下 27-4 秋田住友ベーク
株式会社内

【氏名】 田中 速雄

【特許出願人】

【識別番号】 000002141

【住所又は居所】 東京都品川区東品川 2丁目 5番 8号

【氏名又は名称】 住友ベークライト株式会社

【代表者】 守谷 恒夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003539

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫分析用容器

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析に用いられる分子に対して低吸着性である材料で成形され、及び／又は表面を覆われていることを特徴とする免疫分析用容器。

【請求項2】 分析に用いられる分子に対して低吸着性である材料が水に不溶である請求項1記載の免疫分析用容器。

【請求項3】 分析に用いられる分子に対する低吸着性である材料の吸着が $1 \times 10^{-1} \text{ p m o l} / \text{c m}^2$ 以下である請求項1又は2記載の免疫分析容器。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗原抗体反応を利用して抗体又は抗原を検出する免疫分析における試薬や検体の保存、希釈、反応に用いる容器の材質及び表面処理に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

従来の免疫分析において、使用する試薬または検体の保存及び希釈にポリスチレン又はポリプロピレン製の容器を使用しているが、これらの容器を用いた場合、非特異的吸着が存在するため、試薬又は検体の種類により差はあるが容器への物理吸着による試薬の減少及び試薬溶液濃度の変化が必ず発生してしまう。

又、測定に使用する容器においても、固相化法と呼ばれる免疫分析法では、容器表面に固相化させた蛋白を利用して分析を行うため容器表面に固相化試薬量を増やすため水酸基等の官能基を導入し親水-疎水のバランスを調節する事で飽和吸着量を増やす、いわゆる高吸着処理がなされたものが使用されていたが、近年容器表面に蛋白を固相化させないシンチレーション・プロキシミティー・アッセイ（SPA法）といった逐次添加法が開発され、反応物と未反応物の分離を必要としない本法は、自動機に合った測定法として注目されている。

【 0 0 0 3 】

逐次添加法においては、反応の際に分子の固相化は行わず、反応は溶液中若しくは溶液中のビーズ等の担体において行われる。

よって、容器表面に対して不必要な吸着が生じると溶液中の反応を阻害したり効率を低下させてしまう。

ところが、現在それらに使用されている容器としては吸着に対して考慮された物はなくポリスチレン又は、ポリプロピレンといった成形性、透明性、耐低温性のみを考慮した材料を特に吸着を抑えるための表面処理もせずに用いられており、試薬のロス及び感度の低下の問題を容器の特性の方向から解決するといったアプローチは全くなされていなかった。

【 0 0 0 4 】

現在までに免疫分析容器表面の非特異的吸着を制御する為にいくつかの技術が検討され、開示されている。例えば、最も一般的に行われている方法としては、測定系に対して不活性な蛋白質をコーティングするいわゆるブロッキングと呼ばれる方法であるが、この方法は基本的に蛋白質の非特異的吸着を利用しているため、コーティング毎にブロッキング効果がばらつきやすく、蛋白質の状態によっても効果は左右されやすい。又ブロッキング剤は吸着しているだけであるので簡単に溶液中に遊離してしまうため保存用には用いることは出来無い。特開平 6 - 1 7 4 7 2 6 号公報及び特開平 7 - 1 2 8 3 3 6 号公報では蛋白質を化学的に固定化する事で前述のような遊離を無くしているが、蛋白質は乾燥や保存温度、保存期間によって構造変化を起こす可能性が高く、実際の容器として汎用性は望めなかった。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上述のような問題点を解決すべく鋭意検討の結果なされたもので、免疫分析容器表面を測定に用いる分子に対して低吸着とすることで不要な吸着による反応の阻害又は効率の低下を防止し、試薬の減少、試薬濃度の変化のない免疫分析容器の開発、更に低吸着の性質を有する水不溶性の材料の成形又は被覆によって低吸着の特性を得る事で、保存試薬中への材料の脱離防止、保存性、取扱

性の向上を図るものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

即ち本発明は、分析に用いられる分子に対して低吸着性である材料で成形され、及び／又は表面を覆われていることを特徴とする免疫分析用容器である。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の容器の形状としては従来用いられているサンプルチューブ、遠沈管、マルチウェルプレート、キュベット等特に限定するものではない。

現在免疫分析容器に用いられている材料は、ポリスチレン又はポリプロピレンといった疎水性の材料であるが、一般的に水溶液中において蛋白質は疎水性表面に吸着しやすく、特に従来より多く使用されているポリスチレンに対しては殆どの種類の蛋白は多量に吸着してしまう。

そこで、本発明の特徴とする低吸着性な表面を得るためには、親水性高分子例えば PHEMA (ポリヒドロキシエチルメタクリレート) 等のコーティング、又は疎水性の材料でも超疎水性と言われるフッ素等のコーティング、さらにポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 等の材料を用いることで低吸着性のある表面を獲得する事が出来る。

【0008】

また、一度ポリスチレン等の成形に適した材料で成形した容器の表面に水酸基、カルボキシル基を導入して親水性にすることで低吸着性を付与することが出来る。

例えば、成形性を重視してポリスチレン、ポリプロピレンの様に非特異的吸着の起こりやすい材料を使用する場合には、プラズマ暴露によるカルボキシル基、カルボニル基及び／または水酸基の導入、透明性を重視してポリメチルメタクリレートを使用する場合であればアルカリによる表面部分加水分解でカルボキシル基を導入する等の表面改質により低吸着性の表面を実現することが出来る。

【0009】

ポリスチレン又はポリプロピレンといった従来の容器の吸着量は約 1～10 p

mol/cm^2 又はそれ以上であり、分析に用いる溶液中の分子は溶液の濃度及び容器との接触面積にもよるが、約20%～50%が容器に吸着する。ここで、吸着した20%～50%の分子が溶液中の反応に必須のものであれば、反応効率つまり測定感度は20%～50%低下してしまうこととなり、吸着した分子が吸着による構造変化のため不必要な反応を引き起こすような物質であれば、大きなノイズとなってしまう。

よって、分析に用いられる分子が全く吸着しない容器が最も理想的であるが、実質的には吸着量を現状の $1/10 \sim 1/100$ にする事で十分に効果が得られる。

【0010】

本発明は吸着制御による測定感度の向上以外にも大きな特徴を有する。つまり通常、蛋白質は吸着を起こすと構造が変化してしまい、免疫分析に於いては目的とする蛋白が測定系に存在しているにも係わらず構造変化のために検出するための抗体に検知されない場合がある。また、臨床検査等に於いては生体内に存在する状態での血清を検査する必要があるにも係わらず、実際は吸着により構造変化を起こした状態での検査を余儀なくされている。

しかし本発明においては蛋白が吸着しない事により構造変化を起こすことなく、臨床検査に於いては血清をより生体内で存在している状態と近い状態で測定出来る。このメリットは免疫分析容器としては非常に大きいといえる。

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明する。

【0011】

【実施例】

(実施例1)

市販のポリスチレン製チューブ（栄研チューブ RIA用3号 70-12458）の表面にポリヒドロキシエチルメタクリレート（SIGMA製 P-3932）をコーティングしたものを実施例1とした。

(実施例2)

ポリテトラフルオロエチレンを切削し、実施例1で用いたチューブと同じ内径、容積のチューブを作製し実施例2とした。

(比較例)

市販のポリスチレン製チューブ（栄研チューブ RIA用3号 70-12458）を比較例として用いた。

【0012】

(測定感度の比較)

溶液中の反応における測定感度を評価するために、実施例1、2及び比較例を反応容器として用い、反応担体としてELISAボールを用いた測定を実施した。

予め、0.125、0.250、0.500 $\mu\text{g/mL}$ の濃度系列で調整したビオチンヒドラジド（Dojindo製）のリン酸緩衝液（pH7.4）溶液を用いてELISAボール（住友ベークライト製 アミノ基ボール）にビオチンヒドラジドをグルタルアルデヒドを介して共有結合により固相化し、3段階のビオチンヒドラジド固相化密度のELISAボールを作製した。

【0013】

尚、ELISAボールの固相化されたビオチンヒドラジド以外の箇所については、スキムミルクにてブロッキングを行い吸着を防止した。

実施例1、2及び比較例のチューブ各3本に該3段階のビオチンヒドラジド固相化密度のELISAボールを入れ、ペルオキシターゼ標識アビジン（Cappe社製）の1 $\mu\text{g/mL}$ リン酸緩衝液（pH7.4）溶液を500 mL/チューブで分注し、室温で30分反応させた。

反応後、洗浄液（リン酸緩衝液 pH7.4 + 0.05% Tween 20）で洗浄し、未反応のペルオキシターゼ標識アビジンを洗浄した後、市販のペルオキシターゼ用発色キット（住友ベークライト製 ML-1120T）を用いて発色、プレートリーダーにより450 nmの吸光度を測定した。

【0014】

結果は図1の通りで、実施例においてはELISAボール表面に導入されたビオチンヒドラジド密度に応じて吸光度も直線的に変化しているのに比べ、比較例においては、全ての密度で吸光度に殆ど変化は見られない。

つまり、実施例に於いては、ELISAボール表面に導入されたビオチンヒド

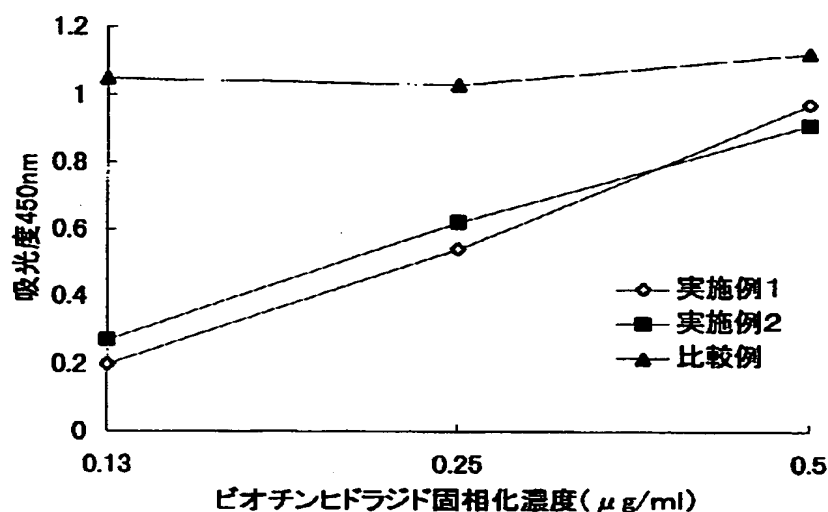
ラジドに対してのみペルオキシターゼ標識アビジンが反応しており、その結果吸光度はビオチンヒドラジド密度と比例しているが、比較例に於いては、吸着によりチューブに残留したペルオキシターゼ標識アビジンが、バックグラウンドとなって感度が低下したためと考えられる。

【0015】

【図1】

$\mu\text{g/ml}$	実施例1	実施例2	比較例
0.125	0.2	0.27	1.05
0.25	0.54	0.62	1.03
0.5	0.97	0.91	1.12

ELISAボールを用いたビオチン-アビジン反応



【0016】

(保存容器としての蛋白回収率の比較)

非特異的吸着性を比較するため、酵素で標識した抗ウシアルブミン抗体（コスモバイオ製）を 0.1 ng/ml 、 1 ng/ml 、 10 ng/ml 、 100 ng/ml の濃度系列で、各濃度を24ウェルずつ分注し、 -80°C で48時間保存し、保存後の溶液中の蛋白濃度を基質溶液を用いて測定した。

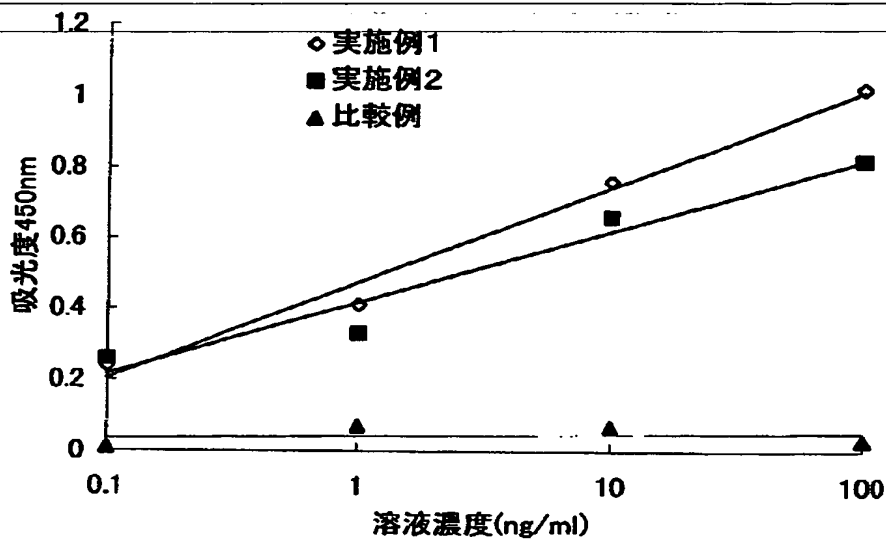
結果は、図2の通りで、実施例1及び2のプレートともに比較例に比べ蛋白回収率が高い事を確認した。

【0017】

【図2】

ng/ml	実施例1	実施例2	比較例
0.1	0.24	0.26	0.01
1	0.41	0.33	0.07
10	0.76	0.66	0.07
100	1.02	0.82	0.03

保存後の蛋白濃度(吸光度の比較)



【0018】

【発明の効果】

本発明の免疫分析用容器は、分析に用いられる分子に対して低吸着性な材料で成形された、及び／または分析に用いられる分子に対して低吸着性な材料で覆われておりその材料が水不溶性である事により、微量反応及び溶液反応系の測定感度を高めることを可能とし、試薬の保存、希釈容器として用いた場合には吸着による試薬の損失が少ない。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 微量反応、溶液反応系の免疫分析の感度を高めた免疫分析容器。試薬の保存、希釈時に、試薬の損失の少ない免疫分析容器。

【解決手段】 感度低下、精度低下、試薬損失の原因が吸着に大きく影響される事に着目し、分析容器の表面に分析に用いられる分子に対して低吸着性な材料を用いることにより、上記目的の免疫測定用基材を得た。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002141]

1. 変更年月日 1995年 2月10日

[変更理由] 住所変更

住 所	東京都品川区東品川2丁目5番8号
氏 名	住友パークライト株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)